

ヒト胃粘膜におけるmineral-corticoid receptor ならびに11 β -hydroxysteroid dehydrogenaseの発 現に関する研究

著者	加藤 勝章
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54867

①

博士論文

目次

ヒト胃粘膜における mineralocorticoid receptor
ならびに 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase
の発現に関する研究

研究目的・背景・・・・・・・・・・・・・ 8 頁

研究方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8 頁

研究結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23 頁

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 30 頁

文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32 頁

図表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 38 頁

東北大学医学部第三内科

内科学系専攻

加藤勝章

①
博士論文

ヒト胃粘膜における mineralocorticoid receptor
ならびに 11β -hydroxysteroid dehydrogenase
の発現に関する研究

研究方針・・・・・・・・・・ 8頁

研究結果・・・・・・・・・・ 20頁

考察・・・・・・・・・・ 23頁

結論・・・・・・・・・・ 30頁

文献・・・・・・・・・・ 32頁

図表・・・・・・・・・・ 38頁

東北大学医学部第三内科

内科学系専攻

加藤勝章

-目次-

要約	1 頁
研究背景	3 頁
研究目的	8 頁
研究方法	8 頁
研究結果	20 頁
考察	23 頁
結論	30 頁
文献	32 頁
図表	38 頁

要約

消化管は、水および電解質吸収の調節に関連して、mineralocorticoidの標的臓器となっている。一方、胃粘膜においても、胃酸分泌に関連して、種々の電解質輸送が行われており、mineralocorticoidの調節を受ける可能性がある。しかしながら、これまで、ヒト胃粘膜における mineralocorticoid receptor(MR)の有無については詳細な検討が行われていない。

また、 11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β -HSD) は、aldosterone 標的臓器におけるステロイド結合に選択性を与えている生理的調節因子のひとつであるが、胃粘膜における発現について詳細な検討は行われていない。

そこで、本研究では、mineralocorticoid receptor (MR)と 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type II (11β -HSD2)の発現について、 $[^3\text{H}]$ -aldosterone binding assay、MRならびに 11β -HSDの免疫組織化学、さらに、これらの mRNA を Northern blot analysis

ならびに RT-PCR 法により検討した。

[³H]-aldosterone binding assay では、胃体部粘膜に [³H]-aldosterone の specific binding が認められたが、前庭部には認めなかった。Scattered plot analysis により、胃体部粘膜の MR の K_d は 0.72 ± 0.05 nmol/L (mean \pm S.E.)、 B_{max} は 5.99 ± 1.38 fmol/mg protein (mean \pm S.E.) であった。MRmRNA の Northern blot ならびに RT-PCR により、胃粘膜で MRmRNA の発現が確認された。免疫組織化学ならびに電顕観察より、MR 発現細胞は胃底腺の壁細胞であることが示された。さらに、11 β -HSD2 の RT-PCR ならびに免疫組織化学により、胃底腺の壁細胞は MR とともに 11 β -HSD2 をも発現していることが示された。

以上の結果より、胃粘膜においては壁細胞が MR とともに 11 β -HSD2 をも発現しており、mineralocorticoid の標的細胞である可能性が示された。

mineralocorticoid は胃酸分泌に関連する種々の電解質輸送に重要な役割を果たしているものと考えられた。

研究背景

消化管は、mineralocorticoid の代表的な標的組織である。mineralocorticoid のひとつである aldosterone は、 Na^+ 膜透過性亢進、能動的 Na^+ 吸収ならびに K^+ 分泌刺激、さらに、transmucosal potential difference 増強作用を示すことが知られている⁽¹⁻⁵⁾。これらの作用は大腸を中心とした下部消化管における水および電解質吸収の調節に関連している。

aldosterone の作用は、cortisol 他の glucocorticoid と同じように、細胞質内レセプターによって伝達される⁽⁶⁾。すなわち、aldosterone は、標的臓器の細胞質内に入り、mineralocorticoid receptor と結合し、核内へ移行する。さらに、この steroid-receptor 結合体は、核 DNA 上の特異的結合部位を認識して結合することによって、電解質輸送に関わる種々の遺伝子の転写活性を刺激するといわれている⁽⁷⁾。

mineralocorticoid は、cortisol 等の glucocorticoid と同様に、細胞質内レセプターに結合し、このステロイ

ド-レセプター結合体が核内へ移行し、核 DNA 上の特異的結合部位に結合して作用することが知られている。mineralocorticoid ならびに glucocorticoid の細胞質レセプターは、それぞれ類似したアミノ酸配列を有し、type I receptor (mineralocorticoid receptor; MR)、type II receptor (glucocorticoid receptor; GR) と呼ばれている。

これら 2 つのレセプターは、mineralocorticoid ならびに glucocorticoid に対して共役して結合できるが、各レセプターに対する aldosterone の親和性に違いがある。すなわち、MR は aldosterone に対して高親和性のレセプターであり、一方、GR は aldosterone に対して低親和性であり glucocorticoid のレセプターとして作用するといわれている⁽⁷⁻⁹⁾。MR は、腎臓や大腸、また、汗腺や十二指腸、膵臓などの水・電解質代謝が行われる臓器に広く分布している⁽¹⁰⁻¹⁴⁾。

さらに、これらの mineralocorticoid 標的臓器においては、 11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β -HSD) が MR とともに存在することで、

mineralocorticoid と MR との結合の特異性が維持されている⁽¹⁵⁾。すなわち、11 β -HSD は、glucocorticoid 活性を持つ cortisol や corticosterone を不活性型の 11keto-steroids である cortisone や 11dehydrocorticosterone に転換する酵素である。血清中の glucocorticoid は aldosterone に比べて 100～1000 倍もの濃度があり、aldosterone がその標的臓器で特異的に作用を発現するには、MR とともに存在する 11 β -HSD の作用により、glucocorticoid が不活性型に転換されることが必要と考えられている^(16, 17)。

実際、11 β -HSD の先天的欠損症(apparent mineralocorticoid excess syndrome)⁽¹⁸⁾や酵素阻害⁽¹⁹⁾により、過剰な Na⁺や水の貯留、K⁺排泄、また、血圧上昇をみるなどといった glucocorticoid の aldosterone 作用の増強が起こることが報告されている。

11 β -HSD には、現在 2 つの isotype の存在が知られている。type 1 は、NADP⁺と NADPH 要求性で 11 β -dehydrogenase 活性と同時に 11-oxoreductase 活性を合わせ持ち、肝臓をはじめ、腎尿細管、皮膚、大腸な

どに広搬に分布している⁽²⁰⁾。しかしながら、type 1-11 β -HSD が示す 11 β -dehydrogenase 活性は K_m 値が 1 μ M 程度であり、その基質特異性は低いといわれている⁽²⁰⁾。一方、type 2 は NAD^+ 要求性で 11 β -dehydrogenase 活性の特異性が高く、その K_m 値は nM 単位である⁽²¹⁾。type 2-11 β -HSD (11 β -HSD2) も水・電解質代謝に関与する臓器に MR と共存して広く分布していることが報告されており⁽²²⁾、これらの協同作用により aldosterone の作用が効率よく調節されていると考えられている。

ところで、胃酸の分泌過程には、HCl のみならず Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- や HCO_3^- などの様々な電解質の輸送機構が関与している⁽²³⁻²⁵⁾。これら電解質の膜輸送は、他の mineralocorticoid 標的臓器にみられるものと同等のメカニズムによって行われているものと考えられる。しかしながら、これまで、胃粘膜細胞と mineralocorticoid との関連については殆ど検討されていない。

かつて、消化性潰瘍の治療に、甘草やその有効成分である glycyrrhetic acid、また、その誘導体である carbenoxolone が用いられていたことがあった。これら

は、抗潰瘍作用を有してはいたが、浮腫や心不全、低 K^+ 血症といった hyperaldosteronism 様の副作用を呈することから現在では用いられなくなった薬物である。これらの薬物による hyperaldosteronism 様の病態は、primary aldosteronism とは異なり、renin 分泌抑制と同時に aldosterone 分泌も抑制されており、Conn はこの病態を licorice-induced pseudoaldosteronism と命名した⁽²⁶⁾。

この病態の発生機序については、glycyrrhetic acid や carbenoxolone が MR に対する親和性を有すること^(27,28)や 11β -HSD 阻害作用を有し内因性 aldosterone 様作用を増強するなどとの報告^(29,30)があり、MR や 11β -HSD2 を介したものであると考えられている。

さらに、この pseudoaldosteronism 様の副作用は aldosterone の競合阻害薬である spironolactone^(31,32) や Na^+/H^+ -exchanger の阻害薬である amiloride⁽³³⁾ との併用によって消失するが、同時に抗潰瘍作用も失われてしまうことが報告されている。

以上のことは、mineralocorticoid が胃粘膜に対して

も何らかの作用を持ちうる可能性を示唆している。

研究目的

先に述べたように、胃粘膜が mineralocorticoid の標的臓器のひとつである可能性が示唆されているが、これまで胃粘膜に MR ならびに 11β -HSD2 が存在するか否かについての検討は殆どなされてはいない。

そこで、本研究では、ヒト胃粘膜における MR ならびに 11β -HSD2 の発現の有無について、 $[^3\text{H}]$ -aldosterone binding assay、Northern blot analysis、Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)法、免疫組織化学により検討した。

研究方法

1. 対象

^3H -aldosterone binding assay、Northern blot

analysis ならびに RT-PCR 法には、早期胃癌手術症例の胃体部標本 10 例ならびに胃前庭部標本 5 例、内視鏡下鉗子生検による胃体部ならびに胃前庭部標本各 5 例の新鮮凍結標本を用いた。各標本は、肉眼的に正常な部位からそれぞれ採取し、直ちに液体窒素で凍結、測定まで -80°C で凍結保存した。さらに、凍結標本に隣接した部位の胃粘膜で 10% formalin または 4% paraformaldehyde 固定 paraffin 包埋標本を作製し、組織学的検索を行った。採取された標本は全例、胃体部では胃底腺、前庭部では幽門腺を含む領域であり、胃炎による変化は軽微であった。

MR ならびに 11β -HSD2 の免疫組織化学には、健常胃体部標本 15 例と健常胃前庭部標本 10 例の 4% paraformaldehyde もしくは 10% formaline 固定 paraffin 包埋標本を用いた。

2. [^3H]aldosterone binding assay

[^3H]aldosterone binding assay は、対象標本の

cytosol 分画を用いて行った。各 sample の cytosol 分画は、Krozowski⁽³⁴⁾らに基づき作製した。すなわち、各組織標本から粘膜層のみを剥離し、洗浄後、TMSD buffer [100mM Tris (pH7.4), 250mM sucrose, 100mM Na₂MoO₄, 2mM dithiothreitol] にて homogenate し、105,000 g で 4℃、60 分間遠心した。上清を sample とし、測定まで -80℃ で保存した。sample のタンパク濃度は、Bradford⁽³⁵⁾に基づき測定した。

[³H]aldosterone binding assay は、Armanini らの方法を一部改変して施行した⁽³⁶⁻³⁸⁾。

binding assay のための反応液を以下の如く調整して各々 300 μL 作製し、4℃ で 18 時間反応させた。total binding 反応液は、sample タンパク濃度 1 mg /mL of TMSD buffer、各々 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20nmol/L の [1,2-³H]aldosterone (56Ci/mmol, Amersham Inc., England)、さらに、特異的 glucocorticoid receptor antagonist として合成 glucocorticoid analogue である RU28362⁽³⁹⁾ (Roussel-Uclaf, France より供与)を各 [³H]aldosterone 濃度の 200 倍量の加えた。さらに、

nonspecific binding 反応液には、上記に加えて[1,2- ^3H] aldosterone 各種濃度の 400 倍濃度に相当する未標識 aldosterone (Sigma Co. Ltd., USA)を加えた。

receptor に結合した steroid を分離精製するために、上記反応後の sample 液に、氷冷した 15 % (wt/vol.) hydroxyapatite suspension in 50 mM Tris and 10mM KH_2PO_4 , pH7.2 を 300 μL 加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間吸着させた。ついで、samples を 1000 g で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 分間遠心後、pellets を 10 mM Tris, 5mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM ethylene- diamietetraacetic acid(EDTA), 1% Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate, Sigma Co.Ltd.), pH7.4. を含む洗浄液 1mL で 3 回ずつ洗浄した。洗浄後の pellets を 2 mL の ethanol 中に再攪拌して、室温で 60 分間静置し、steroid を溶出させた。1000 g で 5 分間遠心後、上清を scintillation vials に移し、ASC II (Amersham Inc.)を 10 mL 加えて、各々の radioactivity (dpm)を liquid scintillation counter (PR-2650 ; Packard Inc.)で測定した。

各 sample の MR 結合型[^3H]-aldosterone (specific

binding)は、各 ^3H -aldosterone 濃度の total binding から nonspecific binding を差し引いて算出した。また、sample を加えない未反応の ^3H -aldosterone の各濃度について radioactivity (dpm)をあわせて測定し、この値から specific binding の値を差し引いて free ligand を算出した。

各測定値は、 ^3H -aldosterone の比放射活性を参考に mol 濃度に換算した。これらの測定値を基に Scattered plot analysis を行い、解離定数 (K_d)ならびに最大結合量 (B_{\max}) を算出した。

3. MR mRNA の Northern blot analysis

ヒト胃癌手術症例の健常部胃体部粘膜の新鮮凍結標本から粘膜層のみを剥離し、Cesium chloride gradient 法により tRNA を抽出し、Oligotex-dT30 <super> (Takara Shujo Co.Ltd., Japan)を用いて poly(A)RNA に精製した。抽出した poly(A)RNA の濃度は 260nm 吸

光度から求めた。

2 μ g の poly(A)RNA を formaldehyde 法[最終濃度 17.5%(v/v)formaldehyde+50%(v/v) formamide in 0.02M 3-(Morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) +50mM NaOAs + 10mM EDTA,pH7.0]にて 65℃で 5 分間変性したのち、1.2% agarose gel[0.02M MOPS+ 50mM NaOAs+10mM EDTA,pH7.0] で電気泳動した。これを 20 \times SSC(Standard saline citrate)で nylon membrane(Hybind N⁺, Amersham Inc.)に転写した。

Megasprime DNA labeling system (Amersham Inc.) で ³²P-dATP (Amersham Inc.)をラベルした human MR cDNA⁽⁴⁰⁾ (974bp EcoRI fragment, Dr. Z. S. Krozowski, Medical Research Center, Prince Henry's Hospital, Melbourne, Australia より供与)を用い、42℃で 18 時間 hybridize させた。hybridization buffer の組成は 50% (v/v) formamide, 5 \times SSC, 50mM sodium phosphate, 4 \times Denhardt's solution, 40 μ g/ml salmon sperm DNA である。

2 \times SSC で 10 分間、ついで、2 \times SSC + 2%SDS で 65℃、

45 分間、最後に $0.1 \times \text{SSC}$ で洗浄後、autoradiography を行った。positive control として健常回腸末端の粘膜から抽出した mRNA を用いた。internal control として、human β -actin cDNA probe を用いた。

4. MR ならびに 11β -HSD2 mRNA の RT-PCR と PCR direct sequence

ヒト胃粘膜の胃体部ならびに前庭部からの内視鏡下鉗子生検標本を用い、RT-PCR 法によって MR ならびに 11β -HSD2 mRNA の発現を検討した。

RNeasy Midi kit (QIAGEN Inc., Germany) を用いて、各胃粘膜標本より tRNA を抽出した。tRNA の濃度は 260nm 吸光度から求めた。ついで、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Gibco BRL Products, USA) を用いて、 $1\mu\text{g}$ の tRNA から first strand cDNA を合成した。

PCR の primer sets は、MR については Arriza⁽⁴⁰⁾ が報告した human MR cDNA に基づき sense

primer(1237-1258; 5'-TTCAGCTACACTGCTTCTGG
CA-3') ならびに antisense primer (1790-1811; 5'-G
TACCTTGAGCA CCAATCCTGT-3')を作成した。
human11 β -HSD2⁽⁴¹⁾については Slight S.H.⁽⁴²⁾の報告
に基づき sense primer (525-546; 5'-GACCAAACCAG
GAGACATTAGC-3') ならびに antisense primer(987-
1007; 5'-ATGTAGTCCT TGCCGTAGGC-3')を作成し
た。また、internal control として、 β -actin(XAHR17
および XAHR20 Primer, Funakoshi Co.Ltd, Japan)を
用いた。各 PCR products の理論上の長さは、MR が
574bp、11 β -HSD2 が 483bp、 β -actin が 289bp である。

PCR は GeneAmp PCR System 2400(Perkin Elmer,
USA)を用いて、denaturing 95 $^{\circ}$ C 30 秒、annealing
53 $^{\circ}$ C 1 分間、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分間で 40cycles で施行
した[PCR 反応液の最終濃度、dNTP 50 μ M, primer 0.5 μ M,
Taq DNA polymerase (Takara Shuzo Co.Ltd) 2.5units/100
 μ L, KCl 50mM, Tris-HCl 10mM (pH8.3), MgCl₂ 1.5mM]。
PCR products は 2% agarose gel に電気泳動した。

さらに、PCR products の一部は、ABI Prism Genetic

Analyzer による PCR direct sequence を行った。dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(ABI Prism)を用い、MR と 11 β -HSD2 の RT-PCR products を template に PCR を各々 sense および antisense の 2 方向から施行した。ついで、Shrimp Alkaline Phosphatase(Amersham)による消化を行ったのち、Centri-Sep spin column (ABI Prism)にて精製し、ABI Prism Genetic Analyzer による解析を行った。解析結果は、既知の MR と 11 β -HSD2 の塩基配列^(40, 41)と照合した。

5. MR と 11 β -HSD2 の免疫組織化学

(1) 1 次抗体

MR ならびに 11 β -HSD2 の免疫組織化学には、ウサギ抗ヒト MR ポリクローナル抗体(MINREC4)ならびにウサギ抗ヒト 11 β -HSD2 ポリクローナル抗体(HUH23)(いずれも Dr.Z.S. Krozowski により供与)を用いた。

MINREC4は、ヒトMRのN末端の167アミノ酸残基の合成タンパクに対する抗体である⁽⁴³⁻⁴⁵⁾。また、HUH23は、ヒト11 β -HSD2の16アミノ酸残基からなる合成ペプチドに対する抗体である⁽⁴⁶⁾。

(2) 免疫組織化学

免疫組織化学はHistofine-SAB-PO Kit (Nichirei Co.Ltd.) を用い、Streptoavidine-biotine 法にて施行した。各組織標本は、4%paraformaldehyde もしくは10%formaline にて4℃、18時間固定後、paraffin に包埋した。paraffin 包埋標本を2.5 μ m に薄切し、slide glass にのせた。組織切片は、xylene および ethanol にて脱 paraffin 後、0.3% H₂O₂ in methanol で30分間内因性 peroxidase 活性を阻止した。次に、非特異的な反応を阻止するため、正常ヤギ血清に30分間反応させた。一次抗体を至適濃度に調整し滴下、4℃で約18時間反応させた。各抗体の希釈倍率は、MINREC4(1 : 750)、HUH23(1 : 75)である。次に、biotin 標識抗ウサギ IgG

抗体を室温で 30 分反応させた後、peroxidase 標識 streptoavidin を 30 分間反応させた。最後に、0.06mM 3,3' diamino-benzidine(DAB)+2mM H₂O₂ in 0.05M Tris (pH7.6)で発色させた後、hematoxyline にて核染し、透徹封入した。陰性コントロールとしてウサギ血清を 1 次抗体に代えて免疫染色を行った。

(3) Epon-Araldite 樹脂包埋標本を用いた MR の免疫染色と連続切片による電顕観察

Hogan と Smith らの方法⁽⁴⁷⁾を一部改変し、Epon-Araldite 樹脂包埋標本を用いた MR の免疫染色とその連続切片による電顕観察を行い、MR 陽性細胞の細胞同定を電顕的に行った。

ヒト胃体部標本を 4% paraformaldehyde + 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium phosphate (pH7.4) で 4℃、18 時間固定した。この際、OsO₄ による後固定は抗原性保持のため施行しなかった。

10%(wt/vol.)sucrose を含む phosphate-buffered

saline(PBS)で洗浄、ethanol 系列と propylene oxide で脱水置換後、Epon-Araldite 樹脂混合液 [60mL あたり、17mL Epon812、33mL dodecenyl succinic anhydride、8.8mL Araldite CY212、1.2mL dimethyl-aminomethyl phenol (各々 TAAB Co.Ltd., England)] に包埋し、37℃で18時間、60℃で2日間重合した。2 μ m の光顕用切片とそれに連続した 90nm の電顕用準超薄切片を薄切し、それぞれ MR の免疫染色と電顕観察に用いた。

光顕用切片は、0.5 % KOH in methanol、acetone、benzene の 1:1:1 混合液に 4℃、1 昼夜浸して脱樹脂を行い、1 % acetic acid in methanol で数分間浸し、さらに、methanol で数回洗浄した。この組織切片を用いて上述のとおり MINREC4 による MR の免疫染色を行った。つづいて、連続した準超薄切片にウランと鉛による二重染色を施し、Hitachi H300(Hitachi Co.Ltd., Japan)にて電顕観察を行った。

尚、HUH23 は抗原の保持が悪く本法を用いることはできなかった。

結果

1. [^3H]aldosterone binding assay

胃体部粘膜では[^3H]aldosterone の specific binding が検出された。胃体部粘膜標本 10 例の Scattered plot analysis から、 K_d は 0.72 ± 0.05 nM (mean \pm S.E.)、 B_{\max} は 5.99 ± 1.38 fmol/mg protein (mean \pm S.E.) となった。代表症例の Scattered plot を Figure 1 に示す。胃体部粘膜標本では直線的な plot が得られ、MR との specific binding が認められた。各症例の結果を table 1 に示す。一方、胃前庭部粘膜標本 5 症例では平坦化した plot となり、specific binding が検出されなかった。

[^3H]aldosterone binding assay に用いた各胃粘膜標本の隣接切片による組織学的検索では、いずれも炎症性変化や萎縮性変化の比較的少ない健常に近い胃粘膜であり、胃体部粘膜標本では胃底腺が、また、胃前庭部粘膜標本では幽門腺が観察された。

2. MR mRNA の Northern blot analysis

胃粘膜における MR の mRNA 発現について、Northern blotting 法により解析した。Northern blotting 法では、陽性コントロールとした回腸末端部粘膜標本に一致して約 6.0Kb に淡い hybridized band を認めた(Figure2)。

3. MR ならびに 11 β -HSD2 mRNA の RT-PCR と PCR direct sequence

ヒト胃粘膜の胃体部ならびに前庭部からの内視鏡下鉗子生検標本各 5 例を用い、RT-PCR 法によって MR ならびに 11 β -HSD2 mRNA の発現を検討した。

胃体部粘膜標本では、MR ならびに 11 β -HSD2 に対する RT-PCR により各々 574bp ならびに 483bp に single band となる PCR products が得られた(Figure3)。これは、予想される band の size に一致していた。胃前庭部

3. MR

胃

Northe

photo

胃腸本

認めた

3. MR

PCR

コ

胃腸本

とびに

胃腸本

するRT

single

これは

胃部

でも、11 β -HSD2 に対する PCR products が得られる場合があった。

PCR direct sequence により、RT-PCRにより得られた products は、それぞれ MR ならびに 11 β -HSD2 の既報の塩基配列に一致することが確認された。

4. MR と 11 β -HSD2 の免疫組織化学

健康胃体部領域標本 15 例と健康胃前庭部領域標本 10 例の 4%paraformaldehyde もしくは 10%formaline 固定 paraffin 包埋標本を用い、MR ならびに 11 β -HSD の免疫組織化学を施行した。MR は 10%formaline 固定標本で、一方、11 β -HSD は 4%paraformaldehyde 固定標本でよりよい染色性が得られた。

MR ならびに 11 β -HSD とともに、胃粘膜の腸細胞に一致して染色陽性となった (Figure 4-a, b)。MR は横断腸の腸細胞質と核に陽性となった (Figure 4-a)。一方、11 β -HSD は横断腸の腸細胞質にびまん性に淡く陽性となった (Figure 4-b)。両者とも胃前庭部には明らかな陽性像は

でも、11 β -HSD2 に対する PCR products が得られる場合があった。

PCR direct sequence により、RT-PCR により得られた products は、それぞれ MR ならびに 11 β -HSD2 の既報の塩基配列に一致することが確認された。

4. MR と 11 β -HSD2 の免疫組織化学

健常胃体部領域標本 15 例と健常胃前庭部領域標本 10 例の 4%paraformaldehyde もしくは 10%formaline 固定 paraffin 包埋標本を用い、MR ならびに 11 β -HSD の免疫組織化学を施行した。MR は 10%formaline 固定標本で、一方、11 β -HSD は 4%paraformaldehyde 固定標本でよりよい染色性を得られた。

MR ならびに 11 β -HSD とともに、胃底腺の壁細胞に一致して染色陽性となった(Figure4-a,b)。MR は壁細胞の細胞質と核に陽性となった(Figure4-a)。一方、11 β -HSD は壁細胞の細胞質にびまん性に淡く陽性となった(Figure4-b)。両者とも胃前庭部には明らかな陽性像は

認められなかった。

MR については、Epon-Araldite 樹脂包埋標本を用いた MR の免疫染色とその連続切片による電顕観察を行った(Figure 5-a,b,c)。Epon-Araldite 樹脂包埋標本の MR 陽性細胞に一致する細胞は、電顕観察により、大型で円形の核を有し、管腔側細胞膜に多数の microvilli と細胞質内に多数の intracellular canaliculus と発達した mitochondria を持つ大型細胞であり、壁細胞に一致する電顕像であった。

考 察

本研究では、ヒト胃粘膜における MR および 11β -HSD2 の発現について、 $[^3\text{H}]$ aldosterone binding assay、Northern blot analysis、RT-PCR、さらに、MR と 11β -HSD2 の免疫組織化学と電顕観察により検討し、ヒト胃粘膜においても MR および 11β -HSD2 が発現していることを証明した。

まず、ヒト胃粘膜標本を用いた $[^3\text{H}]$ aldosterone

binding assay では、 $[^3\text{H}]$ aldosterone の specific binding は胃体部領域にのみに検出され、胃前庭部には検出されなかった。Pressley と Funder⁽¹¹⁾はラット胃粘膜の前庭部には $[^3\text{H}]$ aldosterone の specific binding が認められないことを報告しており、本研究の結果を一部裏付けている。胃体部粘膜における MR の K_d 値は $0.78 \pm 0.04 \text{ nM}$ であり、諸家による腎臓や大腸などの mineralocorticoid 標的臓器における報告とほぼ一致した値となっており^(10-14, 36-38, 48)、胃粘膜の胃体部領域にも high affinity mineralocorticoid binding sites が存在していることが示された。さらに、Northern blot 法ならびに RT-PCR 法、PCR direct sequence により、胃粘膜には MR mRNA が発現していることが示された。

以上の結果は、胃粘膜の胃体部領域に MR を発現している細胞が存在することを示している。しかしながら、Fuller ら⁽⁴⁹⁾は、rat 全身臓器における MR mRNA の発現を Northern blot で検索し、胃粘膜組織には MR mRNA の発現を認めなかったと報告している。これと本研究の結果との差異は、種差によるステロイド要求性の違いの

他に、検討に用いた胃粘膜領域の違いが関与しているものと考えられる。本研究で示した Northern blot においても、胃体部領域から得られた sample で検出できた band はごく淡いものであった。

一方、胃粘膜における B_{\max} は 7.05 ± 2.52 fmol/mg protein であった。Rafestin-Oblin ら⁽¹²⁾はヒト下部消化管における mineralocorticoid binding sites の B_{\max} を 70 から 140 fmol/mg protein と報告しており、ヒト胃粘膜における mineralocorticoid binding sites は下部消化管に比べて約 1/10~1/20 程度の低い値となっていた。ヒト大腸粘膜における MR の発現は、その免疫組織化学による検討から、大腸粘膜上皮細胞に広範に認められると報告されている⁽⁴⁴⁾。一方、胃粘膜における MR の発現は、本研究の MR の免疫組織化学ならびに電顕観察の結果から、壁細胞に特異的に認められた。これは、さきの [³H]aldosterone binding assay で前庭部に specific binding が認められなかったこと、さらに、 B_{\max} が低値であったことを裏付ける結果と考えられる。

さらに、本研究では、aldosterone 標的臓器における

ステロイド結合に選択性を与えている生理的調節因子のひとつである 11β -HSD2 の発現について、RT-PCR 法ならびに免疫組織化学により検討した。 11β -HSD2 の RT-PCR により、胃粘膜においても 11β -HSD2 mRNA の発現が検出され、その PCR direct sequence により 11β -HSD2 mRNA 由来の PCR products であることが確認された。さらに、 11β -HSD2 に対する特異抗体を用いた免疫染色からは、明らかに 11β -HSD2 陽性となったのは胃底腺の壁細胞であった。Smith ら⁽⁵⁰⁾は Western blot analysis により rat 胃粘膜にも 11β -HSD2 の発現が認められたと報告しており本研究の結果に一致している。

胃前庭部でも MR や 11β -HSD2 の RT-PCR products が得られる場合があったが、これは、胃前庭部でも壁細胞が混在している場合があることや MR や 11β -HSD2 は血管内皮にも発現が認められること⁽⁵¹⁾など影響が大きいものと考えられる。しかし、用いた方法の感度の違いの影響も考えられ、免疫染色で検出できない胃上皮細胞での発現があるのかもしれない。MR の発現と 11β -

HSD の発現は必ずしも一致するものではなく、脳などでは MR と共存していない 11β -HSD の発現も報告⁽⁵²⁾されており、胃前庭部における MR や 11β -HSD の発現については今後更なる検討が必要と考えられる。

以上の結果から、胃粘膜の壁細胞には MR と 11β -HSD2 が共存しており、壁細胞が mineralocorticoid の標的細胞のひとつとなっている可能性が示されたが、その生理学的意義については依然不明のままである。

胃粘膜における壁細胞の最も重要な機能は胃酸の分泌である。胃酸は壁細胞の microvilli や intracellular canaliculus にある H^+/K^+ -ATPase によって能動的に分泌される⁽⁵³⁾。壁細胞にある H^+/K^+ -ATPase は、リン酸化中間体を作りながら、細胞質内で生成された H^+ を管腔側へ放出し、同時に細胞外の K^+ を細胞質内へ取り込む。取り込まれた K^+ は別の輸送システムによって管腔側へと放出され、 H^+/K^+ -ATPase のシステムにリサイクルされる⁽⁵³⁾。このため、胃酸分泌過程においては壁細胞内外の K^+ の動態が非常に重要な役割を果たしており、単離壁細胞の細胞外液中の K^+ の除去⁽⁵⁴⁾や低 K^+ 血症

⁽⁵⁵⁾、また、低 K^+ 食投与⁽⁵⁵⁾により酸分泌が低下するといった報告もなされている。また、 Na^+/H^+ exchanger の阻害剤である amiloride が胃酸分泌を抑制するとの報告⁽⁵⁶⁾もなされており、胃酸分泌過程には、 $H^+/K^+-ATPase$ 以外にも、様々な電解質輸送機構の協調が必須であることが明らかとなっている。

Na^+ や K^+ などの膜輸送機構は、腎臓や大腸などの電解質代謝に関連する多くの組織では mineralocorticoid による発現調節を受けていることが知られている。したがって、胃粘膜においても、mineralocorticoid が胃酸分泌に関連する Na^+ や K^+ などの膜輸送機構を調節する機構として作用している可能性がある。Baddeley ら⁽⁵⁷⁾ は、Heidenhain pouch を作成した canine のモデルに aldosterone を投与し、胃液中の Na^+/K^+ balance が変化することを報告している。また、adrenalectomy を施行した rat^(58,59) や canine⁽⁶⁰⁾ では胃酸分泌の劇的な低下が起こることも報告されている。これらの報告は、胃酸分泌過程において mineralocorticoid が重要な役割を果たしていることを示唆している。

ところで、先に述べた carbenoxolone の胃酸分泌に対する影響については、酸分泌を抑制するとの報告もあるが、一方で、影響はないとする報告もあり、一定した傾向はみられない⁽⁶¹⁾。carbenoxolone は MR への親和性と 11 β -HSD 阻害作用により内因性の aldosterone 様作用を増強するといわれている⁽²⁷⁻³⁰⁾。この様な内因性 aldosterone 様作用の増強は胃酸分泌には合目的であり、むしろ胃酸分泌には促進的に働く可能性が考えられる。しかし、carbenoxolone は pseudoaldosteronism 様の強い副作用をもち低 K⁺血症を来す。先に述べたように低 K⁺血症は胃酸分泌をむしろ抑制する。これらの相反する要因が関係する結果、carbenoxolone の胃酸分泌に対する影響は一定した結果とはならないものと想定される。carbenoxolone の作用機序については、その後の検討で、胃粘膜防御増強作用が注目されるようになり、プロスタグランジン産生促進などとの関連が報告されている⁽⁶²⁻⁶⁵⁾。

本研究では、胃粘膜に mineralocorticoid receptor と 11 β -HSD2 が存在することを示した。これらの生理

学的意義については未だ不明な点が多いが、胃粘膜に対してステロイドホルモンが与える影響やステロイドにまつわる各種の病態を検討する上で本研究の結果は重要な示唆を与えていると考えられる。今後、更なる研究が待たれるところである。

結 論

ヒト胃粘膜における mineralocorticoid receptor(MR)ならびに 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type II (11β -HSD2)の発現について、 $[^3\text{H}]$ -aldosterone binding assay、Northern blot analysis ならびに RT-PCR、さらに、MR と 11β -HSD の免疫組織化学とその連続切片による電顕観察により検討した。

$[^3\text{H}]$ -aldosterone binding assay では、ヒト胃粘膜の胃体部領域に $[^3\text{H}]$ -aldosterone の specific binding が認められた。Scattered plot analysis により、 K_d は 0.72 ± 0.05 nM(mean \pm S.E.)、 B_{\max} は 5.99 ± 1.38

fmol/mg protein (mean \pm S.E.)であった。MR の Northern blot ならびに RT-PCR により、胃体部領域に MR の mRNA の発現が確認された。免疫組織化学ならびに電顕観察より、MR 発現細胞は胃底腺の壁細胞であることが示された。さらに、11 β -HSD2 の RT-PCR ならびに免疫組織化学により、胃底腺壁細胞は MR とともに 11 β -HSD2 も発現していた。

以上の結果より、胃粘膜においては壁細胞が MR とともに 11 β -HSD2 をも発現しており、mineralocorticoid の標的細胞である可能性が示された。

mineralocorticoid は胃酸分泌に関連する種々の電解質輸送に重要な役割を果たしているものと考えられた。しかしながら、胃粘膜における mineralocorticoid の生理的意義については未だ不明な点も数多く残されており、今後のさらなる検討が待たれるところである。

参考文献

- (1) Edmonds C.J., Marriott J.(1967) The effect of aldosterone and adrenalectomy on the electrical potential difference of rat colon and on the transport of sodium, potassium, chloride and bicarbonate. *J. Endocrinol.* 39,517-531.
- (2) Edmonds C.J., Marriott J.(1970) Sodium transport and short circuit current in rat colon in vivo and the effect of aldosterone. *J. Physiol. (London)* 210, 1021-1039.
- (3) Levitan R., Ingelfinger F.J.(1965) Effect of d-aldosterone on salt and water absorption from the intact human colon. *J. Clin. Invest.* 44,801-808.
- (4) Efstratopoulos A.D., Peart W.S., Wilson G.A.(1974) The effect of aldosterone on colonic potential difference and renal electrolyte excretion in normal man. *Clin. Sci.* 46, 489-499.
- (5) Edmonds C.J., Godfrey R.C.(1970) Measurement of electrical potentials of the human rectum and pelvic colon in normal and aldosterone-treated patients. *Gut* 11, 330-337.
- (6) Feldman D.J., Funder J.W., Edelman I.S. (1972) Subcellular mechanisms in the action of adrenal steroids. *Am. J. Med.* 53,588-596.
- (7) Edelman I.S.(1981) Receptors and effectors in hormone action on the kidney. *Am. J. Physiol.* 241, F333-F339.
- (8) Evans R.M., Arriza J.L.(1989) A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron* 2, 1105-1112.
- (9) Evans R.M.(1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- (10) Swaneck G.E., Highland E., Edelman I.S.(1969) Stereospecific nuclear and cytosol aldosterone-binding proteins of various tissues. *Nephron* 6, 297-316.
- (11) Pressley L., Funder J.W.(1975) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in gut mucosa. *Endocrinology* 97, 588-596.
- (12) Rafestin-Oblin M.E., Lombes M., Michaud A., et.al.(1984) Mineralocorticoid receptors in the epithelial cells of human colon and ileum. *J. Steroid Biochem.* 20, 311-315.

- (13) Schulman G., Miller-Diener A., Litwack G. et.al. (1986) Characterization of the rat colonic aldosterone receptor and its activation process. *J. Biol. Chem.* 261, 12102-12108.
- (14) Binder H.J., White A., Whiting D., et.al. (1986) Demonstration of specific high affinity receptors for aldosterone in cytosol of rat colon. *Endocrinology* 118, 628-631.
- (15) Krozowski Z.S., Funder J.W. (1988) Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding sites have identical intrinsic steroid specificity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 80, 6056-6060.
- (16) Edwards C.R., Stewart P.M., Burt D., et.al. (1988) Localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*. 2(8618), 986-989.
- (17) Funder J.W., Perce R.T., Smith A.I. (1988) Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*. 242, 583-585.
- (18) Stewart P.M., Corrie J.E.T., Shackleton C.H.L., et.al. (1988) Syndrome of apparent mineralocorticoid excess. A defect in the cortisol-cortisone shuttle. *J. Clin. Invest.* 82, 340-349.
- (19) Monder C., Stewart P.M., Lakshmi V., et.al. (1989) Licorice inhibits corticosteroid 11 β -dehydrogenase of rat kidney and liver: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 125, 1046-1053.
- (20) Monder C., White P.C. (1989) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam. Horm.* 47, 187-271.
- (21) Ruvalcaba E., Naray-Fejes-Toth A (1993) A new isoform of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in aldosterone target cells. *J. Biol. Chem.* 268, 10717-10720.
- (22) G. Hirasawa, H. Sasano, K. Takahashi, et.al. (1997) Colocalization of 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase Type II and Mineralocorticoid Receptor in Human Epithelia. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 82, 3859-3863.
- (23) Muallem S., Blissard D., Cragoe E.J., Jr., et.al. (1988) Activation of Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchange by stimulation of acid secretion in the parietal cell. *J. Biol. Chem.* 263, 14703-14711.

- (24) Horie S., Yano S., Watanabe K., et.al. (1992) Effects of drugs acting on Cl^- - HCO_3^- exchangers on acid secretion in the rat gastric mucosa sheet preparation. *Eur.J. Pharmacol.* 229, 15-19.
- (25) Paradiso A.M., Tsien R.Y., Demarest J.R., et.al. (1987) Na^+ - H^+ and Cl^- - HCO_3^- exchange in rabbit oxyntic cells using fluorescence microscopy. *Am. J. Physiol.* 253, C30-C36.
- (26) Conn J.W., Rover D.P., and Coken E.L. (1968) Licorice-induced pseudoaldosteronism, hypertension, hypokalemia, aldosteropenia and suppressed plasma renin activity. *JAMA*, 205, 492-496.
- (27) Armanini D., Karbowiak I., Krozowski Z., et.al. (1982) The mechanism of mineralocorticoid action of carbenoxolone. *Endocrinology* 111, 1683-1686.
- (28) Armanini D., Karbowik I., Funder J.W. (1983) Affinity of liquorice derivatives for mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Clinical Endocrinology* 19, 609-612.
- (29) Funder J.W. (1990) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the meaning of life. *Molec. Cell. Endocrinol.* 68, c3-c5.
- (30) McKenzie M.A., Hoefnagels W.H.L., Jansen R.W.M.M., et.al. (1990) The influence of glycyrrhetic acid on plasma cortisol and cortisone in healthy volunteers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 1637-1643.
- (31) Davies G.J., Rhodes J., Calcraft B.J. (1974) Complications of carbenoxolone therapy. *Br. Med. J.* 3, 400-402.
- (32) Doll R., Langman M.J.S., Shields R. (1968) Treatment of gastric ulcer with carbenoxolone : antagonistic effect of spironolactone. *Gut* 9, 42-45.
- (33) Reed, P. I., Lewis, S. I., Vincent-Brown, A., Holdstock, D. J., et.al. (1980) The influence of amiloride on the therapeutic and metabolic effects of carbenoxolone in patients with gastric ulcer. A double-blind controlled trial. *Scand J Gastroenterol Suppl* 60, 51-57.
- (34) Krozowski Z.S., Funder J.F. (1983) Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 6056-6060.

- (35) Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- (36) Amanini D., Strasser T., Weber P.C. (1985) Characterization of aldosterone binding sites in circulatory human mononuclear leucocytes. *Am. J. Physiol.* 248, E388-E390.
- (37) Murase H., Yasuda K., Mercardo-Asis L.B., et.al. (1991) 19-Hydroxyandrostenedione does not modulate [3 H]aldosterone binding to human mononuclear leukocytes and rat renal cytosol. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 38, 331-337.
- (38) Shimada T., Yasuda K., Mori A., et.al. (1993) Aldosterone binding to mineralocorticoid receptors of mononuclear leukocytes in diabetic subjects. *Acta Endocrinol.* 128, 529-535.
- (39) D. Doyle, R. Smith, Z.S. Krozowski, et.al. (1988) Mineralocorticoid specificity of renal type I receptors: binding and metabolism of corticosterone. *J. Steroid Biochem.* 33, 166-170.
- (40) Arriza J.L., Weinberger C., Cerelli G., et.al. (1987) Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA; structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 237, 268-275.
- (41) Cloning and tissue distribution of the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol. Cell. Endocrinol.* 105, R11-R17.
- (42) Simon H.S., Venkatesh K.G., Celso E.G. et al. (1997) High Affinity NAD $^{+}$ -dependent 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the Human Heart. *J Mol Cell Cardiol* 28, 781-787.
- (43) Krozowski Z.S., Rundle S.E., Wallace C., et.al. (1989) Immunolocalization of mineralocorticoid receptors with an antiserum against a peptide deduced from the complementary deoxyribonucleic acid sequence. *Endocrinology* 125, 192-198.
- (44) Fukushima K., Sasano H., Nagura H., et.al. (1991) Immunohistochemical localization of mineralocorticoid receptor in human gut. *Tohoku J. Exp. Med.* 165, 155-163.

- (45) Sasano H., Fukushima K., Sasaki I., et.al. (1992) Immunolocalization of mineralocorticoid receptor in human kidney, pancreas, salivary, mammary and sweat glands : a light and electron microscopic immunohistochemical study. *J. Endocrinol.* 132, 305-310.
- (46) Krozowski Z.S., MaGuire J.A., Stein-Oakley A.N., et.al. (1995) Immunohistochemical localization of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme in human kidney and placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 2203-2209.
- (47) Hogan D.L., Smith G.H. (1982) Unconventional application of standard light and electron immunocytochemical analysis to aldehyde-fixed, araldite-embedded tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 30, 1301-1306.
- (48) Stephenson G., Krozowski Z., Funder J.W. (1984) Extravascular CBG-like sites in rat kidney and mineralocorticoid receptor specificity. *Am. J. Physiol.* 246, F227-F233.
- (49) Fuller P.J., Verity K. (1990) Mineralocorticoid receptor gene expression in the gastrointestinal tract : Distribution and ontogeny. *J. Steroid Biochem.* 36, 263-267.
- (50) Smith E.R., Kevin X.Z. Li, Robert K.A., et.al. (1997) Immunohistochemical and molecular characterization of the rat 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type II enzyme. *Endocrinology* 138, 540-547.
- (51) R. Takeda (1993) Production of Mineralocorticoid and Enzyme Expression for Steroidogenesis in Blood Vessels as Components of the Vascular Auto-/Paracrine System. *Folia Endocrinol.* 69, 1101-1122.
- (52) Roland B.L., Funder J.W. : Localization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat tissues: insitu studies. *Endocrinology* 137, 1123-1128, 1996.
- (53) 長屋秀明, 佐藤宏 (1994) acid pump, 130-137, 胃-形態とその機能 (川井啓市編, 医学書院, 東京)
- (54) Ostrowski J., Zych W., Dowy K. et.al. (1991) The relationship between extracellular K^+ and Ca^{2+} on aminopyrine accumulation in rat parietal cells. *J Physiol Pharmacol.* 42, 279-91.

- (55) Ekblad E.B., Licko V. (1990) Extracellular potassium is necessary for acid translocation but not for acid formation in gastric mucosa. *Biochim Biophys Acta* 1054, 41-48.
- (56) Seidler, S. Roithmaier, M. Classen, et.al. (1992) Influence of acid secretory state on Cl^- -base and $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchange and pH_i in isolated rabbit parietal cells. *Am. J. Physiol* 262, G81-G91.
- (57) Baddeley R.M., Evans J., Griffin J.A. (1969) Influence of hyperaldosteronism upon gastric secretion. *Gut* 10, 143-145.
- (58) Tseng C.C., Schmidt K.L., Johnson L.R. (1987) Hormonal effects on development of the secretory apparatus of parietal cells. *Am J Physiol.* 253 (3 Pt 1), G284-G289.
- (59) Matsiuk IaR (1987) Morphofunctional changes in the parietal cells of the stomach after adrenalectomy. *Arkh Anat Gistol Embriol.* 92(2), 61-66.
- (60) Krivova N.A., Gridneva V.I. (1982) Stomach secretion and excretion in mineralocorticoid deficiency. *Biull Eksp Biol Med.* 93(6), 39-41.
- (61) Baron J.H. (1977) Effect of carbenoxolone sodium on human gastric acid secretion. *Gut* 18, 721-722.
- (62) Martin, A. Gurrieri, G. Stumolo, G. C. Naccarato, R. (1983) Effect of carbenoxolone on gastric prostaglandin E release and cytoprotection in the rat. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 12, 409-10
- (63) Minuz, P. Cavallini, G. Angelini, G. et.al. (1984) Carbenoxolone and prostaglandin E2 and F2 alpha gastric juice levels in man *Pharmacol Res Commun* 16 875-84
- (64) Peskar, B. M. 1980 Effect of carbenoxolone on prostaglandin synthesizing and metabolizing enzymes and correlation with gastric mucosal carbenoxolone concentrations *Scand J Gastroenterol Suppl* 65 109-14
- (65) Parodi, M. C. Molinari, F. Barocci, S. (1984) Influence of 'cytoprotective' drugs (carbenoxolone, zolimidine, prostanoic acid) on mucus secretion in patients with gastric ulcer *Scand J Gastroenterol Suppl* 92, 163-166.

No.	Age	Sex	Kd	Bmax
1	72	F	0.77	2.13
2	44	M	0.73	4.75
3	82	M	0.93	15.78
4	37	F	0.72	3.04
5	59	M	0.72	9.52
6	61	M	0.63	3.40
7	68	F	0.78	3.83
8	57	M	0.58	2.27
9	57	M	0.93	9.64
10	47	F	0.41	5.54
mean+/-S.E.			0.72+/-0.05	5.99+/-1.38

Table 1. Patients profile and [³H] Aldosterone Binding to Human Gastric Fundic Mucosa.

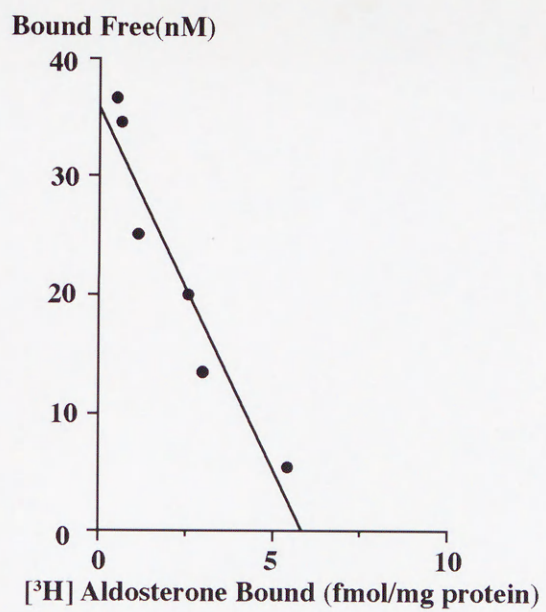


Figure 1. Scatchard plot analysis of $[^3\text{H}]$ Aldosterone Binding to Human Gastric Fundic Mucosa.

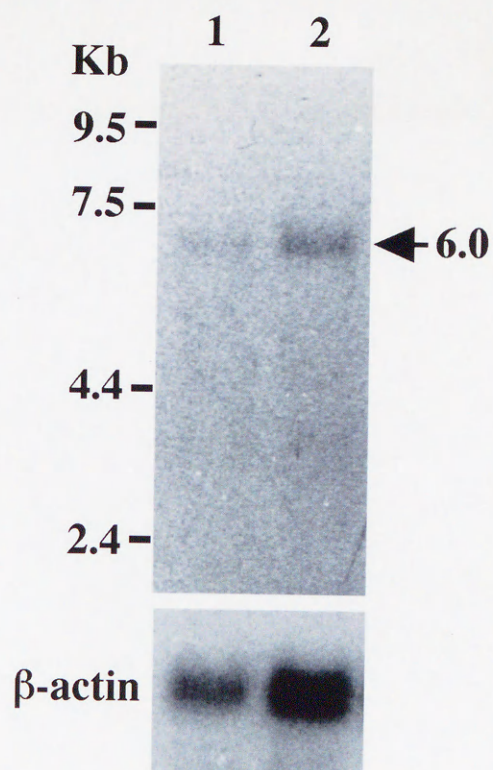


Figure 2. Northern blot analysis of MR mRNA in human fundic mucosa.

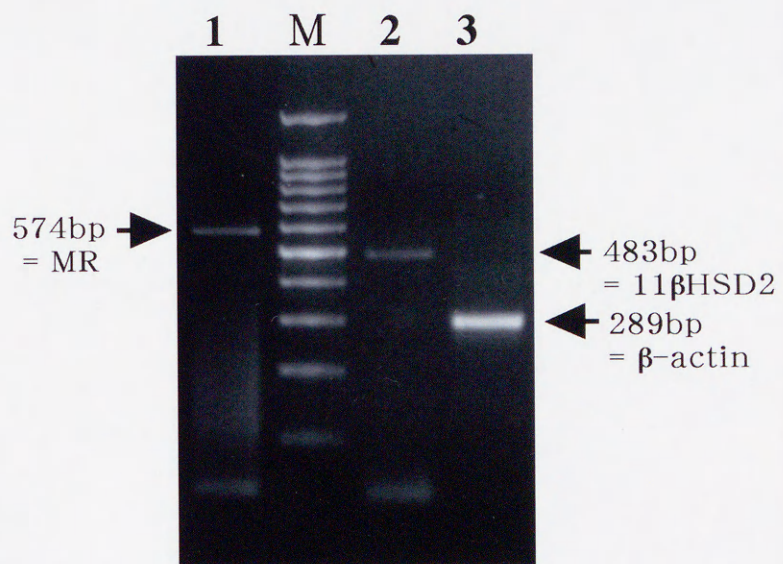
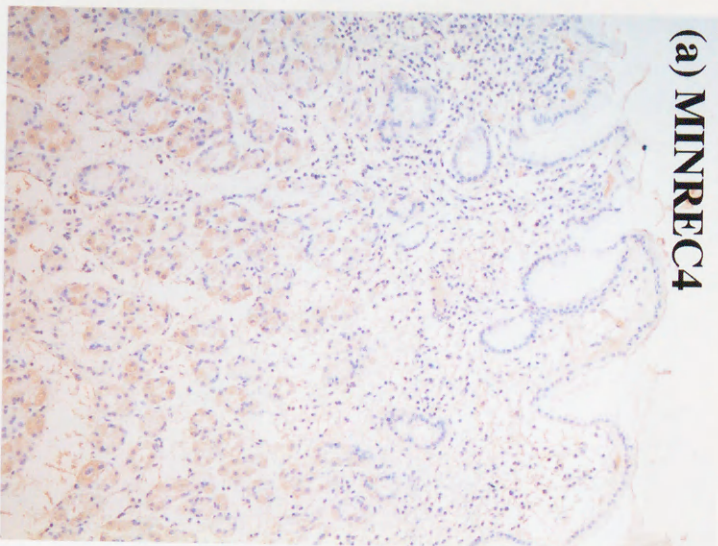


Figure 3. RT-PCR of MR and 11 β -HSD mRNA in human gastric mucosa.

(a) MINRECA



(b) HUH23

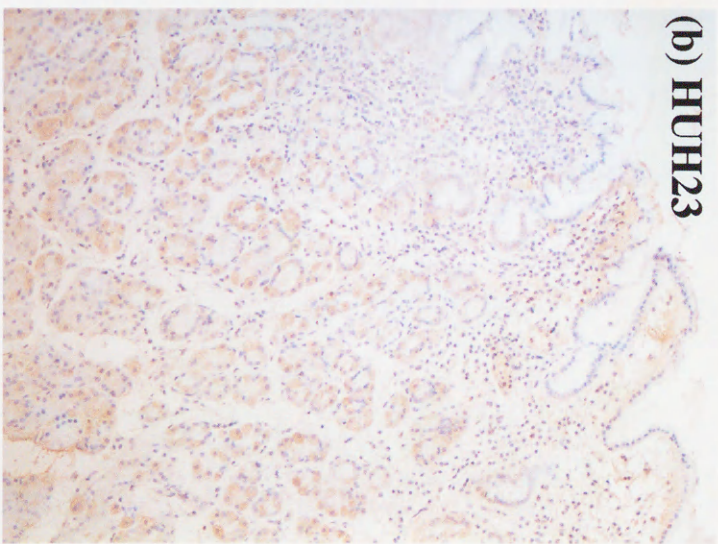


Figure 4. Immunohistochemical staining of human gastric fundic mucosa with MINRECA(a) and HUH23 (b) polyclonal antibodies to the human MR and 11β -HSD2.

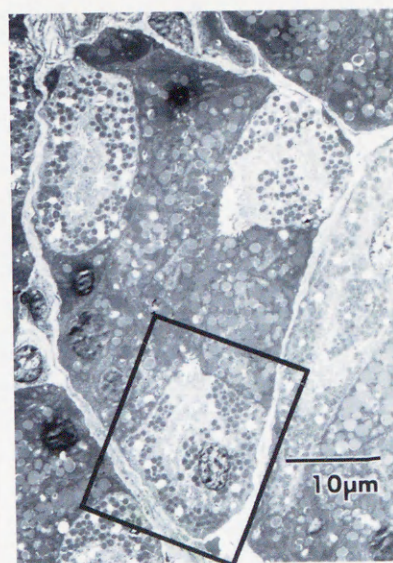
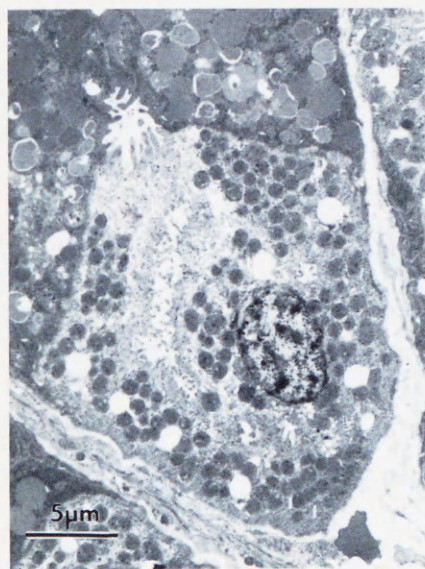
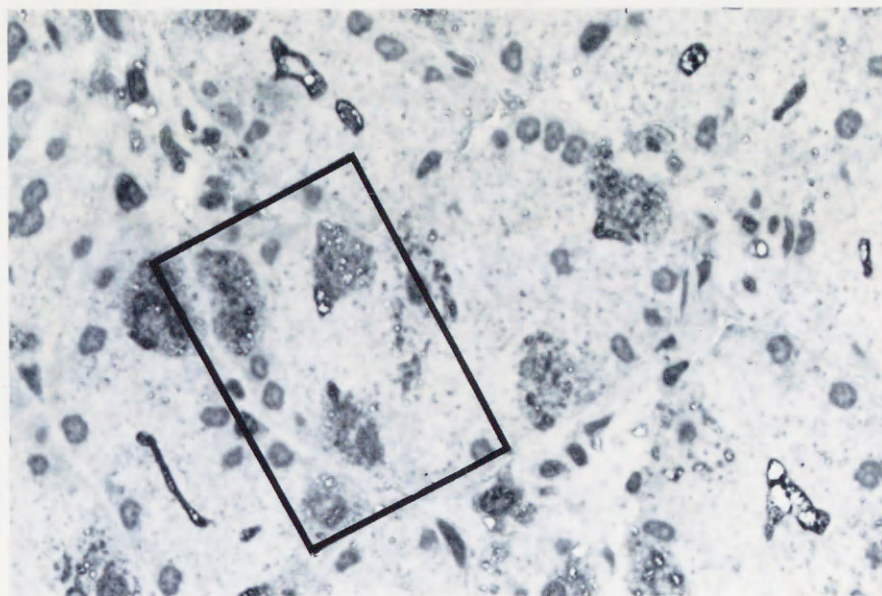
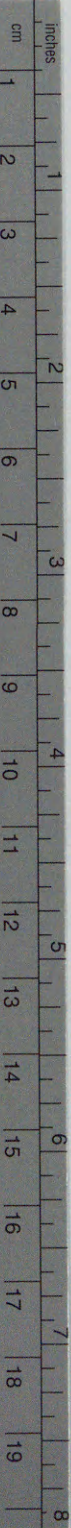


Figure 5. Immunohistochemistry with MINREC4 polyclonal antibody to the human MR(a) and electron microscopy of serial ultrathin sections of human gastric fundic mucosa(b,c).

a	
b	c

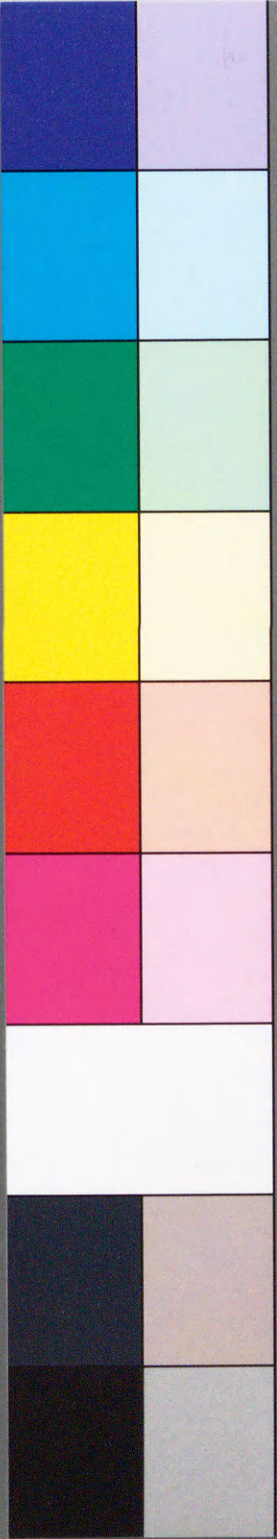




Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

